

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 19 FEV. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

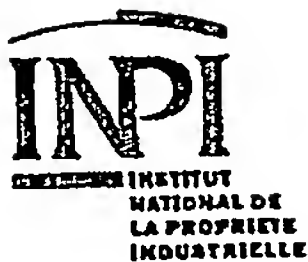
SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU 0202707 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE - 4 MARS 2002 PAR L'INPI		NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet SUEUR & L'HELGOUALCH 109, boulevard Haussmann 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) B0429FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ N° _____	Date ____/____/____ Date ____/____/____
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	N° _____ Date ____/____/____
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Composé phosphocalcique modifié, composition injectable le contenant.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public à caractère scientifique et technique	
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Adresse	Rue	3, rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	75016	PARIS
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU 0202707 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		REÇU PAR L'INPI 4 MARS 2002	
Vos références pour ce dossier : (facultatif)		B0429FR	
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		Cabinet SUEUR & L'HELGOUACH	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	109, boulevard Haussmann	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone (facultatif)		01.53.30.26.30.	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.30.26.39.	
Adresse électronique (facultatif)		sueur@compuserve.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Sulte», Indiquez le nombre de pages jointes		1 page	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Yvette SUEUR (CPI 92-1232)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1... / 1...

RENISE DES PIÈCES
DATE **75 INPI PARIS**
LIEU **0202707**
N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 829 W / 260839

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0429FR	
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation	
		Date / / N°	
		Pays ou organisation	
		Date / / N°	
		Pays ou organisation	
		Date / / N°	
5 DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE DE NANTES	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public à caractère scientifique, culturel et professionnel	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	t, quai de Tourville	
	Code postal et ville	44000	NANTES
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
5 DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public à caractère scientifique et technique	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	101, rue de Tolbiac	
	Code postal et ville	75013	PARIS
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Yvette SUEUR (CPI 92-1232)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

L'invention concerne un composé phosphocalcique modifié par un composé gem-biphosphonique, un procédé pour sa préparation, ainsi que son utilisation pour l'élaboration d'une composition injectable.

5 Le dérèglement de l'activité osseuse d'un individu est à l'origine de nombreuses pathologies osseuses telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget ou les tumeurs ostéolytiques. Compte tenu notamment de l'augmentation de la longévité des personnes, l'ostéoporose est devenu un problème de santé
10 publique et de nombreuses recherches ont été entreprises pour y remédier. Les pathologies osseuses considérées étant provoquées par un déséquilibre du remodelage osseux au profit de l'activité des ostéoclastes, l'une des voies de traitement envisagée a consisté à diminuer l'activité des ostéoclastes,
15 en vue de ralentir la dégradation de la matière osseuse.

Les recherches effectuées sur divers acides gem-biphosphoniques ont montré leur pouvoir inhibiteur de l'activité des ostéoclastes (G. A. Rodan, et al., Therapeutic Approaches to Bone Diseases, 1 septembre 2000, vol. 289,
20 Science, p.1508-1514). L'usage de certains d'entre eux comme médicament a été admis dans divers pays, notamment l'étidronate, le clodronate, le pamidronate, l'alendronate, le risedronate, le tiludronate et l'ibandronate. Des données ont été publiées pour d'autres composés acides gem-
25 biphosphoniques, notamment le zoledronate, l'incadronate, l'olpadronate, le neridronate. Les acides gem-biphosphoniques qui sont utilisés à ce jour pour le traitement de lésions osseuses sont utilisés par voie systémique et génèrent de ce fait quelques effets secondaires indésirables. Ils peuvent
30 provoquer des troubles rénaux lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse, et des troubles du système digestif, notamment des oesophagites ou des ulcères de l'estomac, lorsqu'ils sont administrés par voie orale [(Lin J.H., Bone 1996 ; 18 ; 75-85) ou (Thiébauld D. et al., Osteoporos Int 1994 ; 76-73)]. Un autre inconvénient de l'administration par
35 voie orale réside dans le faible taux d'absorption du principe actif sur la matière osseuse.

On connaît par ailleurs des compositions injectables destinées à former des substituts osseux. FR-2715853 décrit

des compositions pour bio-matériaux de résorption / substitution de tissus de soutien, comprenant une phase minérale composée de BCP ou de calcium-titane-phosphate, et une phase aqueuse liquide comprenant une solution aqueuse d'un polymère
5 dérivé de la cellulose. Ces compositions injectables ne contiennent aucun principe actif.

On connaît également des substituts osseux non injectables, qui se présentent sous forme d'implants. Par exemple, H. Denissen, et al (J. Periodontal, vol. 71, n°2,
10 Février 2000, p. 280-296) décrit des implants d'hydroxyapatite modifiée par adsorption d'un acide gem-biphosphonique particulier, à savoir l'acide (3-diméthylamino-1-hydroxypropylidène)-1,1-biphosphonique ou olpadronate. La libération in situ de l'acide favoriserait la reconstruction osseuse.
15 Cependant, l'hydroxyapatite elle-même présente l'inconvénient d'être très faiblement résorbable.

Le but de la présente invention est de fournir une composition contenant un principe actif inhibant l'activité des ostéoclastes et qui puisse être administrée sans produire
20 les effets secondaires liés à une administration par voie systémique ou à l'utilisation d'un implant solide.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un composé phosphocalcique modifié, un procédé pour sa préparation, ainsi que son utilisation comme principe actif.
25 dans une composition injectable.

Le composé phosphocalcique modifié selon la présente invention peut être obtenu en ajoutant un acide gem-biphosphonique ou l'un de ses sels de métal alcalin ou alcalino-terreux à une suspension d'un composé phosphocalcique précur-
30 seur dans l'eau ultra-pure, en agitant le milieu réactionnel à température ambiante, puis en récupérant par centrifugation le composé formé. Le composé peut être ensuite purifié par lavage à l'eau ultra-pure, suivi d'une filtration et d'un séchage à l'air à température ambiante. Le composé phospho-
35 calcique précurseur est choisi parmi les orthophosphates de calcium ayant une solubilité dans l'eau supérieure à 10^{-12} mol l⁻¹. A titre d'exemple, on peut citer le BCP qui est un mélange d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique β (généralement désigné par β -TCP), le CDA qui est une hydroxyapa-

tite déficiente en calcium (obtenue par exemple par hydrolyse alcaline d'un orthophosphate de calcium acide), et le β -TCP.

Par eau ultra-pure, on entend dans ce texte une eau ayant une résistivité voisine de 18 M Ω cm.

5 L'agitation à température ambiante est maintenue de préférence pendant une durée entre 1 h et 72 h, par exemple pendant 48 heures. La nature de l'agitation et la granulométrie du composé phosphocalcique précurseur ont un effet sur la proportion de composé gem-biphosphonique qui peut être greffé. Il est donc préférable, lorsqu'une granulométrie 10 donnée a été choisie pour le composé phosphocalcique précurseur, d'adapter l'agitation de sorte à ne pas modifier ladite granulométrie.

Les acides ou les sels qui peuvent être utilisés comme 15 composés gem-biphosphoniques répondent à la formule (OY) (OX) P(O) - CR¹R² - P(O) (OX) (OY) dans laquelle X ou Y représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux, R¹ représente H, OH ou un halogène, et R² représente :

- 20 • un hydrogène ou un halogène,
 • un radical alkyle,
 • un radical aminoalkyle dans lequel le groupe amino porte éventuellement un substituant alkyle,
 • un radical alkylamino,
 25 • un radical alkyle portant un substituant aromatique comprenant au moins un atome N,
 • un radical alkyle portant un groupe thioéther aromatique.

Lorsque R¹ et/ou R² représentent un halogène, Cl est particulièrement préféré.

30 Lorsque R² est un radical alkyle, on préfère les alkyles ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

Lorsque R² est un radical aminoalkyle, on préfère les radicaux NH₂(CH)_n- dans lesquels n est inférieur à 6.

Lorsque R² est un radical alkylaminoalkyle, on préfère 35 les radicaux R'R"N(CH₂)_m- dans lesquels R' et R" représentent indépendamment l'un de l'autre H, ou un radical alkyle ayant au plus 5 atomes de carbone, et m est inférieur à 6.

Lorsque R^2 est un radical alkylamino, on préfère les radicaux R^cNH- dans lesquels R^c est un cycloalkyle ayant de 3 à 7 atomes de carbone.

Lorsque R^2 est un radical alkyle portant un substituant
5 aromatique comprenant au moins un atome N, on préfère les alkyles ayant au plus 3 atomes de carbone et portant un groupe pyridinyle ou imidazoyle.

Lorsque R^2 est un radical alkyle portant un groupe thio-
10 éther aromatique, on préfère les alkyles ayant au plus 3 atomes de carbone et portant un groupe phénylthio dans lequel le groupe phényle porte éventuellement un substituant halogène.

Parmi ces composés gem-biphosphoniques, on peut citer :

- l'étidronate ($R^1 = OH$, $R^2 = CH_3$),
- le clodronate ($R^1 = Cl$, $R^2 = Cl$),
- 15 • le pamidronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -CH_2CH_2NH_2$),
- l'alendronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -(CH_2)_3NH_2$),
- le risedronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -CH_2-3\text{-pyridine}$),
- le tiludronate ($R^1 = H$, $R^2 = -CH_2-S-C_6H_4-Cl$),
- l'ibandronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -CH_2-CH_2-N(CH_3)\text{pentyle}$),
- 20 • le zoledronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -CH_2\text{-imidazole}$),
- l'incadronate ($R^1 = H$, $R^2 = -NH\text{-(cycloheptyle)}$),
- l'olpadronate ($R^1 = OH$, $R^2 = CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$),
- le neridronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -(CH_2)_5NH_2$).

Les acides dans lesquels R^2 est un radical alkyle
25 portant un substituant aromatique comprenant au moins un atome N, tels que le zoledronate ou le risedronate, sont particulièrement préférés.

Un composé phosphocalcique modifié selon l'invention est caractérisé par la composition chimique suivante :

30 $Ca_{(10-a)}(Mg, K, Na)_b(PO_4)_{6-c}(HPO_4, CO_3)_d(OH)_{2-e}(F, Cl, CO_3)_f$
 $[(OA)(OE)P(O)-CR^1R^2-P(O)(OA)(OE)]_g$, dans laquelle A et E
 représentent H ou néant, et où R^1 et R^2 ont la signification
 donnée ci-dessus, et $0 < a < 9$; $0 < b < 2$; $0 < c < 5$; $0 < d < 2$; $0 < e < 2$;
 $0 < f < 2$; $g < 0,5$. Lorsque A ou E représente H, l'atome d'oxygène
 35 qui le porte n'est pas lié à la matrice phosphocalcique ou il
 lui est simplement associé par liaison hydrogène. Lorsque A
 ou E est "néant", l'atome d'oxygène qui le porte est coordonné
 à un autre élément de la composition, par exemple à un Ca.

La teneur en acide gem-biphosphonique d'un composé phosphocalcique modifié peut être déterminée par spectroscopie UV-visible selon la méthode décrite par Ames, B.N., notamment dans *Methods in Enzymology*, Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. Eds., Academic Press, Orlando, 1966, vol. 8, pp. 115-118. Elle peut en outre être déterminée par RMN liquide ^{31}P . La caractérisation du composé phosphocalcique modifié peut être effectuée essentiellement par la RMN du solide ^{31}P MAS qui montre à la fois la présence du support phosphocalcique et
 10 celle du principe actif.

Un autre objet de l'invention est une composition utilisable par injection pour le traitement d'ostéoporose ou de récidives de tumeurs lytiques par inhibition de l'activité ostéoclastique. Ladite composition est une suspension du
 15 composé phosphocalcique modifié défini ci-dessus dans une solution ou un gel biocompatible présentant une viscosité permettant le transport de granules de taille comprise entre 40 μm et 500 μm . A titre d'exemple, on peut citer les hydrogels d'intérêt biologique décrits dans Chem. Rev.
 20 (2001) ; 101(7) : 1869-1879, notamment les hydrogels dérivés de la cellulose ou à base d'hyaluronate de sodium.

Le choix du diamètre particulaire est guidé par la cinétique de résorption d'une part et la rhéologie à l'injection d'autre part. Les particules de diamètre
 25 inférieur à 40 μm présentent une cinétique de biorésorption trop rapide et les particules de diamètre supérieur à 500 μm présentent des problèmes de rhéologie à l'injection. Il est toutefois entendu qu'une faible proportion de particules (jusqu'à 10% en volume) peut avoir un diamètre inférieur à
 30 40 μm ou supérieur à 500 μm . Une composition injectable selon l'invention contient de préférence de 40 % à 75 % en masse de composé phosphocalcique modifié, de 60 % à 25 % en masse d'hydrogel, et éventuellement divers additifs. Les additifs sont choisis parmi les composés capables d'introduire divers
 35 ions d'intérêt biologique tels que par exemple : K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , F^- ou Cl^- .

La composition peut être préparée en mettant en suspension dans le milieu approprié le composé phosphocalcique modifié préparé dans une étape préliminaire. Il peut en outre

être préparé en précipitant le composé phosphocalcique modifié in situ, à partir d'un hydrogel défini comme précédemment et préalablement chargé en ions phosphates (respectivement calcium) dans lequel sera ajoutée une solution appropriée
 5 contenant des ions calcium (respectivement phosphates) et la concentration souhaitée en acide biphosphonique.

Le mode d'association entre la matrice phosphocalcique et l'acide biphosphonique est différent suivant la matrice phosphocalcique utilisée, et cette différence se traduit par
 10 une efficacité biologique différente lors de tests in vitro sur des cultures d'ostéoclastes.

La composition selon l'invention, sous forme injectable, permet de traiter localement un problème osseux sur les principaux sites à risques identifiés (col du fémur et corps
 15 vertébraux), à l'aide d'un principe actif connu pour son utilisation par voie systémique qui présente divers inconvénients rappelés précédemment. En outre, la phase phosphocalcique, qui joue le rôle de vecteur du principe actif, exerce un effet complémentaire en ce sens qu'elle
 20 permet de maintenir l'acide gem-biphosphonique en place, et qu'elle constitue une source de calcium et de phosphate nécessaire pour la stimulation du remodelage osseux. L'hydroxyapatite (HA) décrite dans l'art antérieur comme matrice d'un implant imprégné d'un principe actif ne fait pas
 25 partie des composés phosphocalciques utilisables dans la présente invention, car elle a une solubilité relativement faible, elle possède intrinsèquement un caractère faiblement résorbable, et l'introduction d'acide gem-biphosphonique diminue le potentiel de résorbabilité des composés
 30 phosphocalciques de manière générale.

Les exemples

La présente invention est décrite plus en détail par les exemples suivants, qui sont donnés à titre d'illustration, mais auxquels l'invention n'est pas limitée.

35 Les composés et réactifs suivants ont été utilisés :

- eau ultra-pure : eau ayant une résistivité voisine de 18 MΩ cm

- zoledronate de sodium : acide gem biphosphonique commercialisé par la société Novartis
- tiludronate de sodium : acide gem biphosphonique commercialisé par la société Sanofi-Synthélabo
- 5 ▪ CDA voie NaOH : hydroxyapatite déficiente en calcium obtenue par hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté avec une solution aqueuse de NaOH), sous forme de granules ayant une granulométrie entre 40-80 μm)
- 10 ▪ CDA voie ammoniacque (hydroxyapatite déficiente en calcium obtenue par hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté avec de l'ammoniacque), sous forme de granules ayant une granulométrie entre 40-80 μm
- β -TCP, sous forme de granules ayant une granulométrie entre 40-80 μm .

15

Exemple 1Préparation d'un composé phosphocalcique modifié

On a préparé une suspension de phosphate de calcium en introduisant 700 mg de BCP ayant une granulométrie de 40-80 μm , dans 3,5 ml d'eau ultra-pure, et on a ajouté 56 mg (0,14 mmol) de zoledronate. On a placé la suspension dans un tube maintenu à température ambiante, et on a agité par un agitateur rotatif à 16 tr/min pendant 48 h. Ensuite, on a centrifugé la suspension et on a séparé le culot du surnageant.

25 La phase solide a ensuite été lavée plusieurs fois avec de l'eau ultra-pure, puis filtrée et séchée à température ambiante.

Le procédé a également été mis en œuvre à partir des composés phosphocalciques suivants : CDA voie NaOH, CDA voie ammoniacque et β -TCP.

30

Caractérisation des composés phosphocalciques modifiés

La quantité de zoledronate incorporée dans chacune des matrices phosphocalciques a été déterminée par différence, en dosant la quantité de zoledronate présente dans le surnageant. Ce dosage a été effectué, sur la solution surnageante séparée du culot après centrifugation, par RMN liquide ^{31}P à partir de courbes d'étalonnage préalablement établies. Il

peut également être effectué par spectroscopie UV-visible selon la méthode précitée décrite par Ames.

Les résultats obtenus pour chacun des composés phosphocalciques précurseurs sont donnés dans le tableau ci-dessous. T (%) indique la teneur en zoledronate dans le produit final, exprimée en mg de principe actif pour 100 mg de composé phosphocalcique, et P (%) indique le pourcentage de zoledronate fixé sur le composé par rapport à la quantité introduite dans le milieu réactionnel :

Précurseur	T (%)	P (%)
BCP	1	13
CDA voie NaOH	5,2	65
CDA voie ammoniacque	6,4	80
β -TCP	6,4	80

La figure 1 représente le spectre RMN liquide ^{31}P du surnageant obtenu après centrifugation du milieu réactionnel correspondant au précurseur CDA (voie NaOH). L'intégration des signaux rend compte de l'abondance de chaque espèce et le déplacement chimique (caractéristique de l'espèce) est porté en abscisse. Le pic 1 représente la teneur en zoledronate, le pic 2 représente le phosphate relargué dans le milieu par le composé phosphocalcique et le pic 3 représente la référence NaH_2PO_4 .

Le spectre RMN liquide ^{31}P des composés obtenus à partir des autres précurseurs (sauf l'hydroxyapatite) est analogue et l'on remarque dans tous les cas un relargage de phosphate en cours de réaction.

La caractérisation des solides obtenus montre deux modes d'association différents du zoledronate suivant la nature du composé phosphocalcique de départ. La figure 2 représente une photographie par microscopie électronique à balayage (M.E.B.) effectuée sur le composé issu du β -TCP. Elle montre qu'une forme de zoledronate (probablement associée à du calcium) cristallise à la surface de la matrice phosphocalcique. Le même phénomène est observé dans le cas du BCP.

Les données RMN du solide ^{31}P MAS sont représentées sur la figure 3 pour le composé issu du β -TCP. Le spectre 1

acquis en mode CP (Polarisation Croisée) permet d'observer sélectivement le zoledronate incorporé. Les signaux fins rendent compte de sa présence sous une forme cristalline. Le spectre 2 enregistré en mode découplage proton permet
5 d'observer sélectivement le support β -TCP non altéré.

Le spectre RMN du solide ^{31}P CP-MAS est représenté sur la figure 4 pour le composé issu du CDA (voie ammoniacale). Le signal du zoledronate (pic 1) est très large. Aucune phase cristalline n'est détectée à la surface du matériau, ce qui
10 indique probablement une chimisorption du zoledronate à la surface du CDA. Le pic 2 est caractéristique du CDA.

Exemple 2

Préparation de composés phosphocalciques modifiés par le tiludronate et l'acide méthylène biphosphonique

15 On a préparé une suspension de phosphate de calcium en introduisant 700 mg de β -TCP ayant une granulométrie de 40-80 μm , dans 3,5 ml d'eau ultra pure, et on a ajouté 52,5 mg (0,14 mmol) de tiludronate. On a placé la suspension dans un tube maintenu à température ambiante, et on a agité par un
20 agitateur rotatif à 16 tr/min pendant 48 h. Ensuite, on a centrifugé la suspension et on a séparé le culot du surnageant.

La phase solide a ensuite été lavée plusieurs fois avec de l'eau ultra-pure, puis filtrée et séchée à température
25 ambiante.

Une réactivité semblable à celle enregistrée avec le zoledronate est observée. La figure 5 montre le spectre RMN ^{31}P CP-MAS du β -TCP traité par le tiludronate. Le tiludronate peut être observé sous forme d'une phase cristalline (massif
30 1 constitué de signaux fins) déposée sur la phase phosphocalcique (qui apparaît faiblement (massif 2) dans ces conditions d'enregistrement du spectre.

Exemple 3

Préparation d'une composition injectable

35 On a préparé une composition injectable à partir de chacun des composés modifiés obtenus dans les exemples 1 et

2, à l'exception des composés modifiés obtenus à partir d'hydroxyapatite, selon le procédé suivant.

Pour chaque composé modifié, on a préparé des granules dont 95% en volume avaient un diamètre particulaire équivalent compris entre 40 et 80 μm , et on a introduit ces granules dans une solution aqueuse contenant 3% d'hydroxypropylméthylcellulose comprenant 21% en masse de groupe méthyle et 8% en masse de groupe hydroxypropyle avec un degré de polymérisation égal à 110, de façon à obtenir une composition comprenant 49% en masse de granules.

Chacune des compositions ainsi préparées a été introduite dans un flacon de verre et stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

Exemple 4

15 Tests in vitro de phosphates de calcium modifiés

Des cellules osseuses totales, isolées à partir d'os longs de lapins nouveaux-nés, ont été utilisées pour évaluer l'efficacité de l'association du composé phosphocalcique modifié. Les performances du BCP modifié et du CDA voie ammoniacale modifié obtenus dans l'exemple 1 ont été mesurées et comparées avec celle du précurseur phosphocalcique respectif non traité par l'acide gem-biphosphonique.

Pour chaque essai, on a chargé dans un premier puit de culture deux pastilles de dentine de cachalot (composé de référence pour la mesure de la résorption) et une pastille de composé phosphocalcique non traité, et dans un second puit de culture, deux pastilles de dentine et une pastille de composé phosphocalcique traité en surface.

L'activité de résorption des ostéoclastes dans ces conditions de culture a été évaluée (après 5 jours) par trois paramètres différents :

- 1- Le nombre de total de lacunes formées à la surface de la dentine de cachalot
- 2- La surface moyenne des lacunes
- 35 3- La surface de dentine résorbée.

Il apparaît que :

- En présence de pastilles de BCP modifiées par 1 % de zoledronate en poids, l'activité de résorption résiduelle des cellules osseuses du modèle était indétectable.
- En présence de pastilles de CDA modifiées par 6,4 % de zoledronate en poids, l'activité de résorption des
5 cellules était réduite d'environ 80 % par rapport au contrôle sans zoledronate.

Ces résultats montrent que les performances du matériau résultent non pas de la seule quantité de zoledronate fixée
10 sur la matrice phosphocalcique, mais aussi de la vitesse de relargage du zolédronate, et ils confirment un effet à distance de la matrice phosphocalcique modifiée.

Revendications

1. Composé phosphocalcique caractérisé en ce qu'elle présente la composition chimique suivante :

$$\text{Ca}_{(10-a)} (\text{Mg}, \text{K}, \text{Na})_b (\text{PO}_4)_{6-c} (\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_d (\text{OH})_{2-e} (\text{F}, \text{Cl}, \text{CO}_3)_f$$

$$[(\text{OA})(\text{OE})\text{P}(\text{O})-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{P}(\text{O})(\text{OA})(\text{OE})]_g,$$
 dans laquelle $0 < a < 9$;
 5 $0 < b < 2$; $0 < c < 5$; $0 < d < 2$; $0 < e < 2$; $0 < f < 2$; $g < 0,5$, A et E
 représentent H ou néant, R^1 représente H, OH ou un halogène
 et R^2 représente un élément choisi parmi un hydrogène, un
 halogène, un radical alkyle, un radical aminoalkyle dans
 lequel le groupe amino porte éventuellement un substituant
 10 alkyle, un radical alkylamino, un radical alkyle portant un
 substituant aromatique comprenant au moins un atome N, un
 radical alkyle portant un groupe thioéther aromatique.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 et/ou R^2 représentent Cl.

15 3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical aminoalkyle $\text{NH}_2(\text{CH})_n-$ dans lequel n est inférieur à 6.

20 5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical alkylaminoalkyle $\text{R}'\text{R}''\text{N}(\text{CH}_2)_m-$ dans lequel R' et R'' représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un radical alkyle ayant au plus 5 atomes de carbone, et m est inférieur à 6.

25 6. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical alkylamino $\text{R}^c\text{NH}-$ dans lequel R^c est un cycloalkyle ayant de 3 à 7 atomes de carbone.

7. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical alkyle ayant au plus 3 atomes de
 30 carbone et portant un groupe pyridinyle ou imidazoyle.

8. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical alkyle ayant au plus 3 atomes de carbone et portant un groupe phénylthio dans lequel le groupe phényle porte éventuellement un substituant halogène.

35 9. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 est OH, R^2 est $-\text{CH}_2\text{-imidazole}$, A et E représentent respectivement H et Na.

Revendications

1. Composé phosphocalcique caractérisé en ce qu'elle présente la composition chimique suivante :

$$\text{Ca}_{(10-a)} (\text{Mg}, \text{K}, \text{Na})_b (\text{PO}_4)_{6-c} (\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_d (\text{OH})_{2-e} (\text{F}, \text{Cl}, \text{CO}_3)_f$$

$$[(\text{OA})(\text{OE})\text{P}(\text{O})-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{P}(\text{O})(\text{OA})(\text{OE})]_g,$$
 dans laquelle $0 < a < 9$;
 5 $0 < b < 2$; $0 < c < 5$; $0 < d < 2$; $0 < e < 2$; $0 < f < 2$; $g < 0,5$, A et E
 représentent H ou néant, R^1 représente H, OH ou un halogène
 et R^2 représente un élément choisi parmi un hydrogène, un
 halogène, un radical alkyle, un radical aminoalkyle dans
 lequel le groupe amino porte éventuellement un substituant
 10 alkyle, un radical alkylamino, un radical alkyle portant un
 substituant aromatique comprenant au moins un atome N, un
 radical alkyle portant un groupe thioéther aromatique.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 et/ou R^2 représentent Cl.

15 3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical aminoalkyle $\text{NH}_2(\text{CH})_n-$ dans lequel n est inférieur à 6.

20 5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical alkylaminoalkyle $\text{R}'\text{R}''\text{N}(\text{CH}_2)_m-$ dans lequel R' et R'' représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un radical alkyle ayant au plus 5 atomes de carbone, et m est inférieur à 6.

25 6. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical alkylamino $\text{R}^c\text{NH}-$ dans lequel R^c est un cycloalkyle ayant de 3 à 7 atomes de carbone.

7. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical alkyle ayant au plus 3 atomes de
 30 carbone et portant un groupe pyridinyle ou imidazoyle.

8. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^2 est un radical alkyle ayant au plus 3 atomes de carbone et portant un groupe phénylthio dans lequel le groupe phényle porte éventuellement un substituant halogène.

35 9. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 est OH, R^2 est $-\text{CH}_2$ -imidazole, A et E représentent H.

10. Procédé de préparation d'un composé phosphocalcique modifié selon la revendication, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter un acide gem-biphosphonique ou l'un de ses sels de métal alcalin ou alcalino-terreux à une suspension
5 d'un composé phosphocalcique précurseur dans l'eau ultrapure, à agiter le milieu réactionnel à température ambiante, puis en récupérer par centrifugation le composé formé.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le composé formé est purifié par lavage à l'eau ultra-
10 pure, suivi d'une filtration et d'un séchage à l'air à température ambiante.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le composé phosphocalcique précurseur est choisi parmi les orthophosphates de calcium ayant une solubilité dans
15 l'eau supérieure à 10^{-122} mol l^{-1} .

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le composé phosphocalcique est choisi parmi le BCP, le CDA qui est une hydroxyapatite déficiente en calcium, et le β -TCP.

20 14. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'agitation à température ambiante est maintenue pendant une durée entre 1 h et 72 h.

15. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les acides ou les sels utilisés comme composés gem-
25 biphosphoniques répondent à la formule $(OY)(OX)P(O)-CR^1R^2-P(O)(OX)(OY)$ dans laquelle X ou Y représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux, R^1 représente H, OH ou un halogène, et R^2 représente :

- 30
- un hydrogène ou un halogène,
 - un radical alkyle,
 - un radical aminoalkyle dans lequel le groupe amino porte éventuellement un substituant alkyle,
 - un radical alkylamino,

35

 - un radical alkyle portant un substituant aromatique comprenant au moins un atome N,
 - un radical alkyle portant un groupe thioéther aromatique.

16. Composition utilisable par injection pour le traitement d'ostéoporose ou de récurrences de tumeurs lytiques

10. Procédé de préparation d'un composé phosphocalcique modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter un acide gem-biphosphonique ou l'un de ses sels de métal alcalin ou alcalino-terreux à une suspension
 5 d'un composé phosphocalcique précurseur dans l'eau ultrapure, à agiter le milieu réactionnel à température ambiante, puis en récupérer par centrifugation le composé formé.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le composé formé est purifié par lavage à l'eau ultra-
 10 pure, suivi d'une filtration et d'un séchage à l'air à température ambiante.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le composé phosphocalcique précurseur est choisi parmi les orthophosphates de calcium ayant une solubilité dans
 15 l'eau supérieure à 10^{-12} mol l⁻¹.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le composé phosphocalcique est choisi parmi le BCP, le CDA qui est une hydroxyapatite déficiente en calcium et le β -TCP.

20 14. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'agitation à température ambiante est maintenue pendant une durée entre 1 h et 72 h.

15. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les acides ou les sels utilisés comme composés gem-
 25 biphosphoniques répondent à la formule (OY)(OX)P(O)-CR¹R²-P(O)(OX)(OY) dans laquelle X ou Y représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux, R¹ représente H, OH ou un halogène, et R² représente :

- 30
- un hydrogène ou un halogène,
 - un radical alkyle,
 - un radical aminoalkyle dans lequel le groupe amino porte éventuellement un substituant alkyle,
 - un radical alkylamino,
 - 35 • un radical alkyle portant un substituant aromatique comprenant au moins un atome N,
 - un radical alkyle portant un groupe thioéther aromatique.

16. Composition utilisable par injection pour le traitement d'ostéoporose ou de récurrences de tumeurs lytiques

par inhibition de l'activité ostéoclastique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une suspension du composé phosphocalcique modifié selon la revendication 1, dans une solution ou un gel biocompatible présentant une viscosité
5 permettant le transport de granules de taille comprise entre 40 μm et 500 μm .

17. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que le gel biocompatible est un hydrogel d'intérêt biologique.

10 18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que le gel est un hydrogel dérivé de la cellulose ou un gel à base d'hyaluronate de sodium.

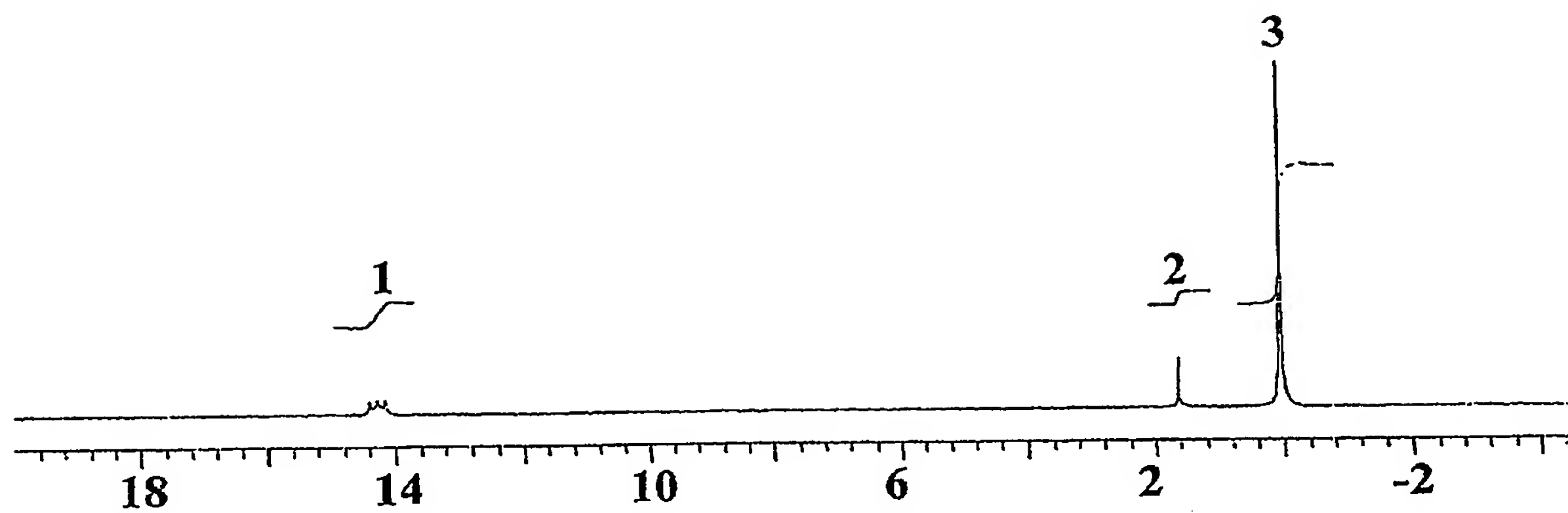


fig. 1

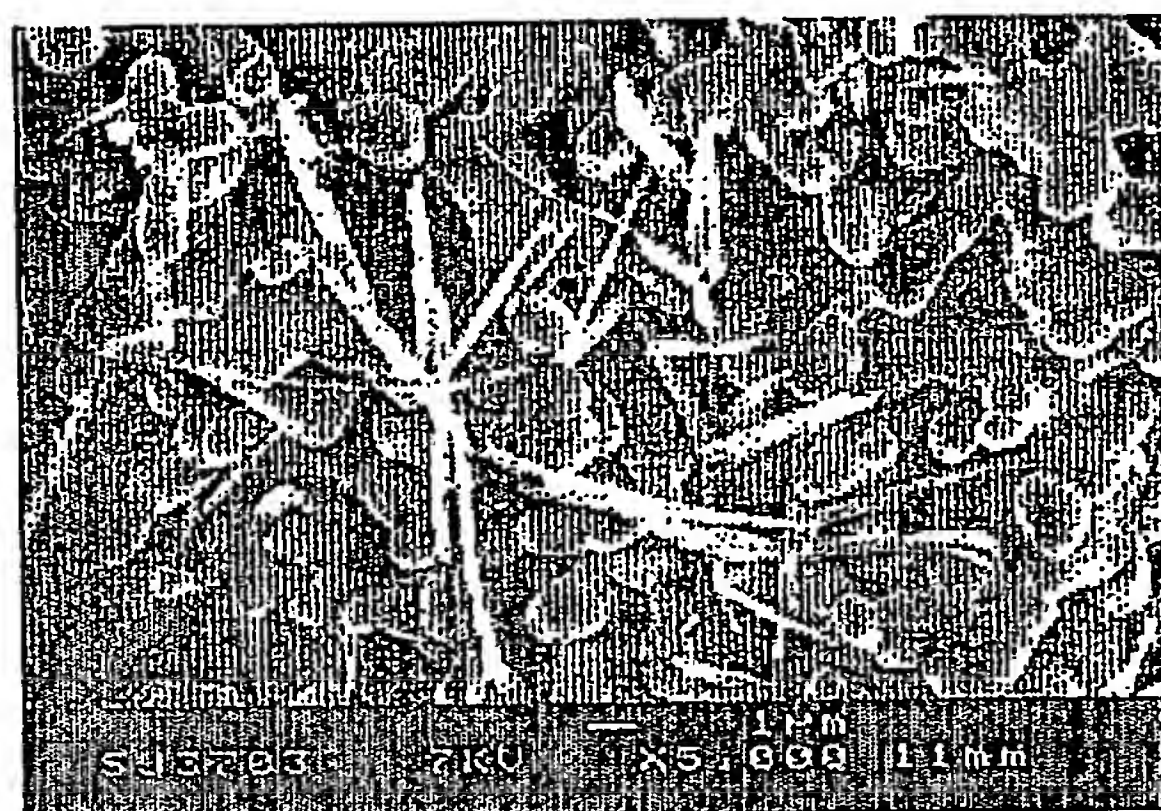


Fig. 2

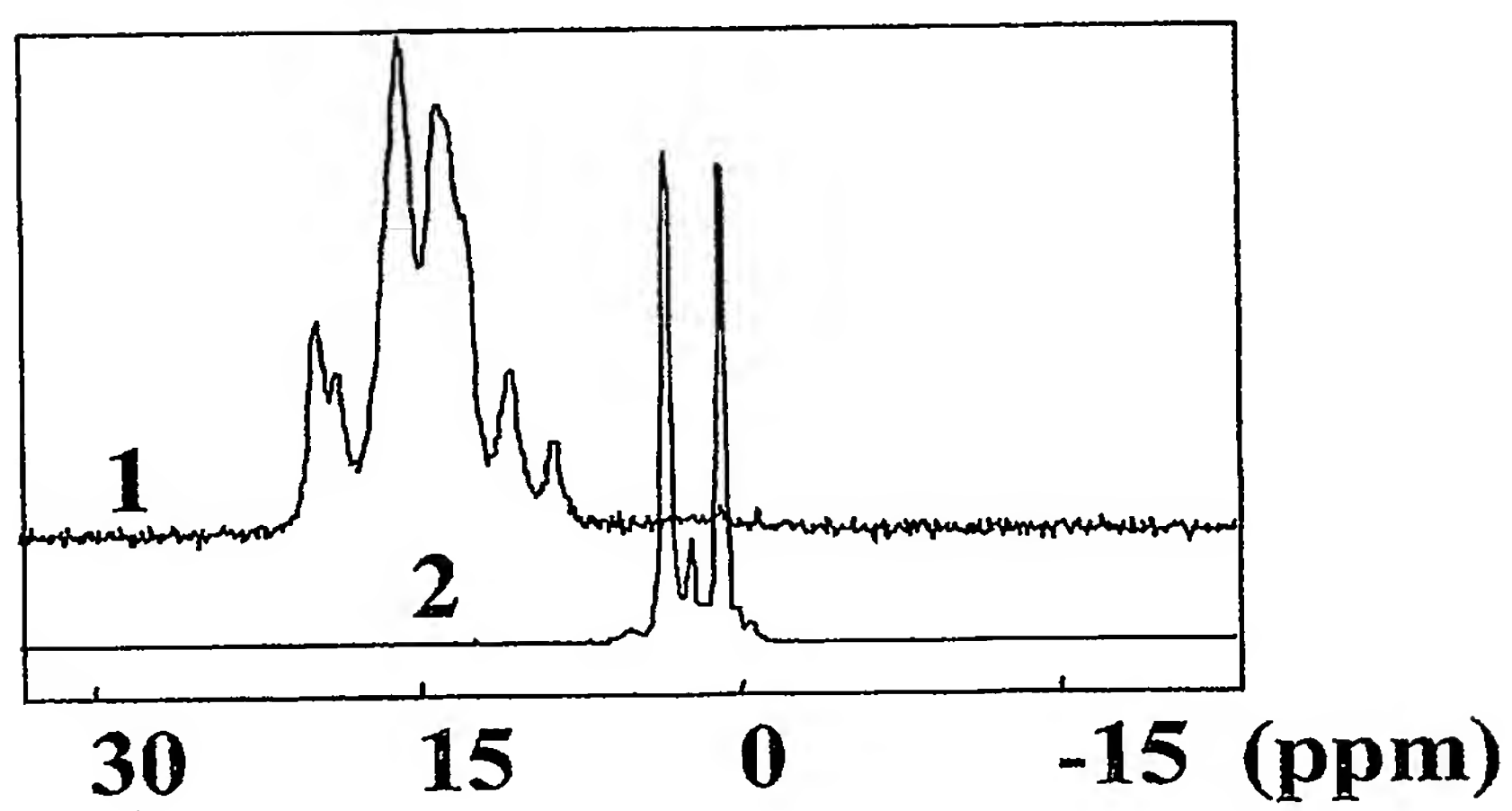


Fig. 3

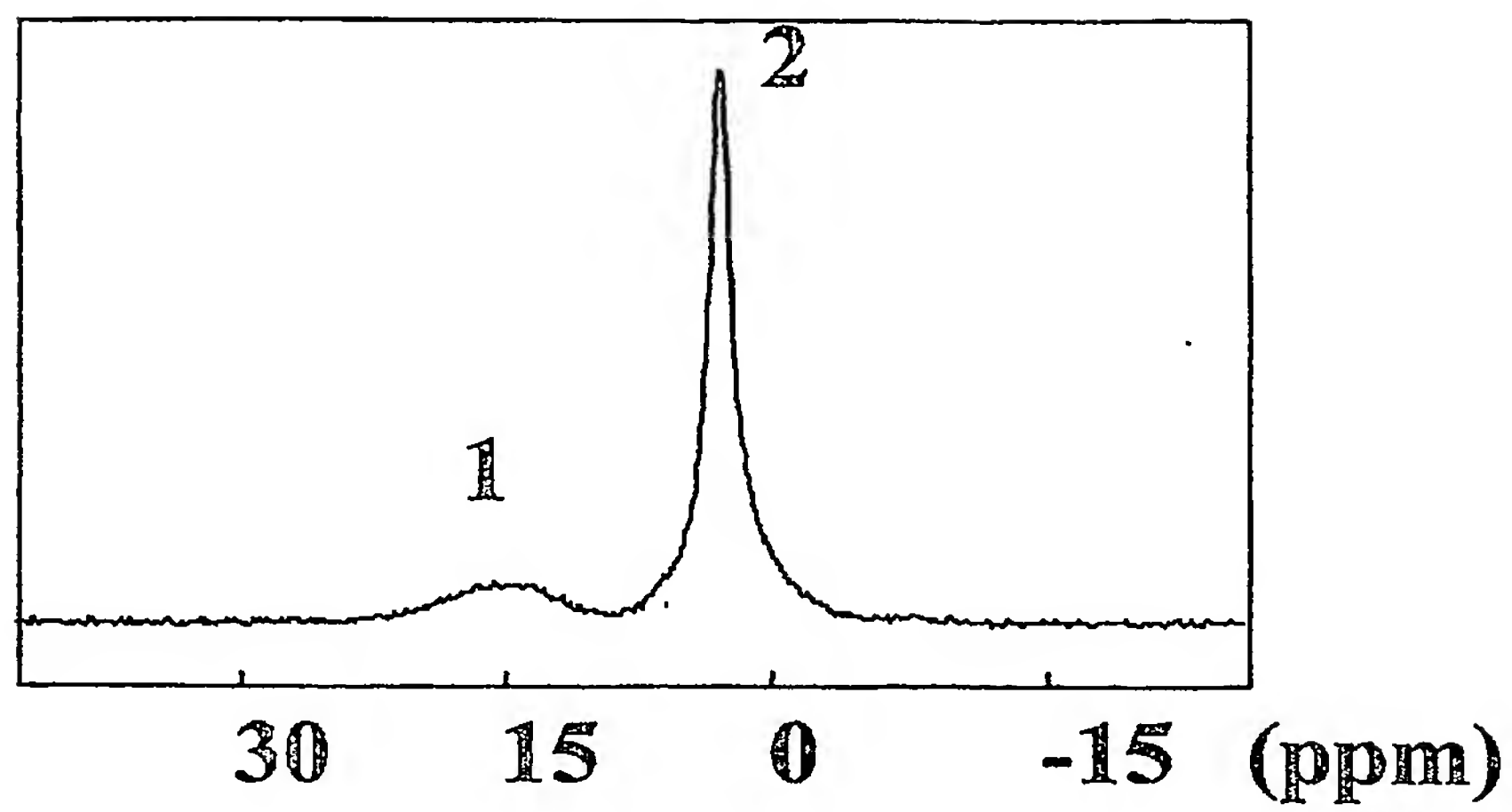


Fig. 4

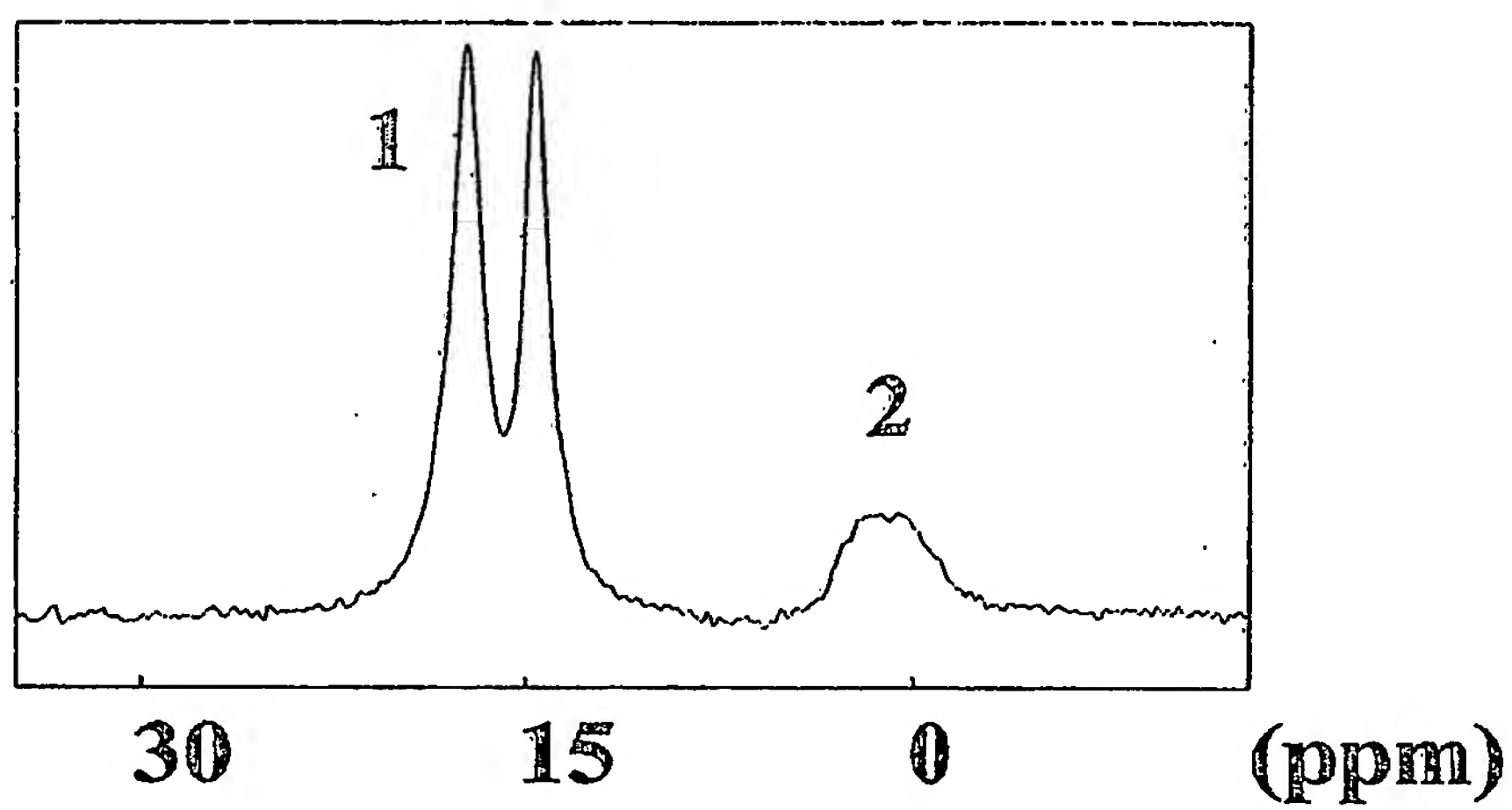
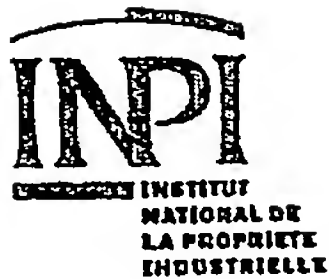


Fig. 5



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235 02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260859

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0429FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0202707	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Composé phosphocalcique modifié, composition injectable le contenant.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITE DE NANTES INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		BUJOLI	
Prénoms		Bruno	
Adresse	Rue	La Basse Bodinière	
	Code postal et ville	44240	SUCE SUR ERDRE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		JOSSE	
Prénoms		Solen	
Adresse	Rue	26, rue Alphonse Daudet	
	Code postal et ville	44000	NANTES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GUICHEUX	
Prénoms		Jérôme	
Adresse	Rue	1bis, rue Perrault	
	Code postal et ville	44000	NANTES
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 4 mars 2002 Yvette SUEUR (CPI 92-1232)			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0429FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0202707	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Composé phosphocalcique modifié, composition injectable le contenant.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITE DE NANTES INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		JANVIER	
Prénoms		Pascal	
Adresse	Rue	Les Berges de Van Iseghem 48, boulevard Van Iseghem	
	Code postal et ville	44000	NANTES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BOULER	
Prénoms		Jean-Michel	
Adresse	Rue	17, Chemin des Baliveaux	
	Code postal et ville	44300	NANTES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		DACULSI	
Prénoms		Guy	
Adresse	Rue	La Favrie du Buron	
	Code postal et ville	44360	VIGNEUX DE BRETAGNE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 4 mars 2002 Yvette SUEUR (CPI 92-1232)			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.